

PCT/JP 2004/009378

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

25. 6. 2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2003年 6月27日

出願番号  
Application Number: 特願2003-184436  
[ST. 10/C]: [JP 2003-184436]

出願人  
Applicant(s): 杉山 治夫

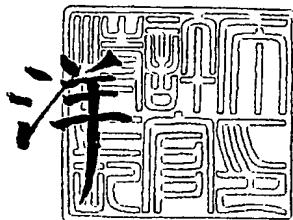
RECEIVED
12 AUG 2004
WIPO PCI

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 7月29日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願

【整理番号】 190337

【提出日】 平成15年 6月27日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/53

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府箕面市船場西 2-19-30

【氏名】 杉山 治夫

【特許出願人】

【識別番号】 595090392

【住所又は居所】 大阪府箕面市船場西 2-19-30

【氏名又は名称】 杉山 治夫

【代理人】

【識別番号】 100081422

【弁理士】

【氏名又は名称】 田中 光雄

【選任した代理人】

【識別番号】 100103230

【弁理士】

【氏名又は名称】 高山 裕貢

【選任した代理人】

【識別番号】 100087114

【弁理士】

【氏名又は名称】 斎藤 みの里

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 204804

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0203207

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 WT1ワクチン適応患者の選択方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の工程（a）、（b）および（c）：

- (a) CTL前駆細胞を含む生体試料を被験患者より単離する工程、
- (b) 前記(a)の生体試料中に存在するWT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を測定する工程、
- (c) 前記(b)の測定結果に基づいてWT1ワクチン応答性を判断する工程、を含む、WT1ワクチン応答性が高い患者の選択方法。

【請求項2】 WT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を、HLAテトラマー法、エリススポット法、リアルタイムRT-PCR法および限界希釈法のいずれかの方法により測定する、請求項1記載の選択方法。

【請求項3】 HLAテトラマー法により測定する、請求項2記載の選択方法。

【請求項4】 以下の工程（a）、（b）、（c）および（d）：

- (a) CTL前駆細胞を含む生体試料を被験患者より単離する工程、
- (b) WT1由来の癌抗原ペプチドを含有するHLAテトラマーと、前記(a)の生体試料とを接触させる工程、
- (c) HLAテトラマーに結合したWT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を測定する工程、
- (d) 前記(c)の測定結果に基づいてWT1ワクチン応答性を判断する工程、を含む、請求項3記載の選択方法。

【請求項5】 請求項4に記載の工程（c）が、CD8陽性またはCD8/CD3陽性のCTL前駆細胞中のHLAテトラマー結合細胞の割合を測定することにより行われる、請求項4記載の選択方法。

【請求項6】 HLAテトラマーの構成成分であるHLA抗原がHLA-A24抗原またはHLA-A2抗原である、請求項4または5記載の選択方法。

【請求項7】 WT1由来の癌抗原ペプチドが、Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu（配列番号：2）、Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu（配列番

号：3）、Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu（配列番号：4）およびArg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe（配列番号：5）より選択される、請求項4～6いずれか記載の選択方法。

【請求項8】 フローサイトメトリーを用いて行われる請求項1～7いずれか記載の選択方法。

【請求項9】 WT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量が、健常人の値と比較して1.5倍以上高いことを指標としてWT1ワクチン応答性を判断する、請求項1～8いずれか記載の選択方法。

【請求項10】 以下の工程（a）～（d）：

- (a) CTL前駆細胞を含む生体試料を被験患者より単離する工程、
  - (b) 前記(a)の生体試料に複数のWT1ワクチンの標的分子をそれぞれ適用し、
  - (c) 前記(b)の生体試料中それぞれに存在するWT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を測定し、それぞれ比較する工程、
  - (d) 前記(c)の測定結果に基づいて、その患者に有効なWT1ワクチンの標的分子を同定する工程、
- を含む、患者固有のWT1ワクチン標的分子の同定方法。

【請求項11】 WT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を、HLAテトラマー法、エリスポット法、リアルタイムRT-PCR法および限界希釈法のいずれかの方法により測定する、請求項10記載の同定方法。

【請求項12】 HLAテトラマー法により測定する、請求項11記載の同定方法。

【請求項13】 以下の工程（a）～（d）：

- (a) CTL前駆細胞を含む生体試料を被験患者より単離する工程、
- (b) WT1由来の複数の癌抗原ペプチドを含有する複数のHLAテトラマーと、前記(a)の生体試料とをそれぞれ接触させる工程、
- (c) HLAテトラマーに結合したWT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量をそれぞれ測定し、比較する工程、
- (d) 前記(c)の測定結果に基づいて、その患者に有効なWT1由来の癌抗原

ペプチドを同定する工程、  
を含む、請求項12記載の同定方法。

【請求項14】 請求項13に記載の工程(c)が、CD8陽性またはCD8／CD3陽性のCTL前駆細胞中でのHLAテトラマー結合細胞の割合を測定することにより行われる、請求項13記載の同定方法。

【請求項15】 HLAテトラマーの構成成分であるHLA抗原がHLA-A24抗原またはHLA-A2抗原である、請求項13または14記載の同定方法。

【請求項16】 WT1由来の癌抗原ペプチドが、Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu(配列番号：2)、Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu(配列番号：3)、Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu(配列番号：4)およびArg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe(配列番号：5)より選択される、請求項13～15いずれか記載の同定方法。

【請求項17】 フローサイトメトリーにより行われる請求項10～16いずれか記載の同定方法。

【請求項18】 WT1由来の癌抗原ペプチドを含有するHLAテトラマーを成分とする、WT1ワクチン応答性が高い患者の選択のための臨床検査薬。

【請求項19】 HLAテトラマーの構成成分であるHLA抗原がHLA-A24抗原またはHLA-A2抗原である、請求項18記載の臨床検査薬。

【請求項20】 WT1由来の癌抗原ペプチドが、Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu(配列番号：2)、Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu(配列番号：3)、Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu(配列番号：4)およびArg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe(配列番号：5)より選択される、請求項18または19に記載の臨床検査薬。

【請求項21】 請求項18～20いずれか記載の臨床検査薬を含有するキット。

【請求項22】 請求項10～17いずれか記載の患者固有のWT1ワクチン標的分子の同定方法により同定された標的分子を含有する、患者固有の癌を処置するための当該患者用の医薬組成物。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、WT1ワクチン応答性が高い患者の選択方法に関する。さらに詳しくは、本発明は、WT1特異的CTL前駆細胞の頻度を指標とした、WT1ワクチン応答性が高い患者の選択方法などに関する。

**【0002】****【従来の技術】**

WT1遺伝子 (Wilms' tumor gene 1) は、小児の腎腫瘍であるWilms腫瘍の原因遺伝子の1つとして同定された (非特許文献1および2を参照)。WT1遺伝子は転写因子WT1をコードしており、WT1は細胞の増殖・分化・アポトーシス及び臓器の形成などに関する重要な働きをする (非特許文献3を参照)。当初、WT1遺伝子は、癌抑制遺伝子と位置付けられていたが、その後の研究により白血病及び肺癌や乳癌を含む種々の固形癌で発現が認められ、むしろ癌の増殖を促進する癌遺伝子としての作用を有することが示された。また、WT1由来のペプチドでHLA-A\*0201陽性またはHLA-A\*2402陽性の末梢血単核球をin vitroで刺激することにより、ペプチド特異的な細胞傷害性T細胞 (CTL) が誘導され、これらのCTLは、内因性にWT1を発現する白血病や固形癌の癌細胞を傷害することが示された。これらの結果より、WT1は癌免疫療法の有望な標的分子であることが示された (非特許文献4を参照)。

**【0003】**

抗原ペプチド特異的なCTLを in vitroで定量する方法としては、HLAテトラマー法 (非特許文献5を参照)、ELISPOT法 (非特許文献6を参照)、リアルタイムRT-PCR法 (非特許文献7を参照)、限界希釈法 (非特許文献8を参照)などが知られている。HLA-テトラマーは、HLA $\alpha$ 鎖と $\beta_2$ ミクログロブリンをペプチドと会合させた複合体 (HLAモノマー) をビオチン化し、蛍光標識したアビシンに結合させることにより4量体化して作製する。HLAテトラマーでペプチド特異的CTLを染色し、フローサイトメーターで解析することによりCTLの頻度を測定することができる。

ワクチンによる刺激前のCTLをCTL前駆細胞（プリカーサー）と称している。特定の癌抗原に対するCTL前駆細胞の存在頻度が高ければ、癌ワクチンとしてその抗原を投与した場合に効率良く特異的なCTLが誘導され、癌ワクチン療法による奏効が得られやすいと考えられる。すなわち、特定の癌抗原に特異的なCTL前駆細胞の存在頻度の高い患者をワクチン投与前に選択することが可能であれば、その癌抗原を用いたより効果的な治療を行うことが可能となる。

#### 【0004】

しかしながら、メラノーマ患者の末梢血単核球（PBMC）を用いたHLAテトラマーによるCTL前駆細胞の頻度測定についてはいくつかの報告がなされているが、癌抗原ペプチド特異的CTL前駆細胞の頻度は1%以下の低値であることが示されている（非特許文献9および10を参照）。このようなことから、抗原に対するCTL前駆細胞の存在頻度は一般的に低いと考えられており、CTL前駆細胞の存在頻度を指標として癌ワクチンの適応患者を選択することは困難であると考えられていた。

#### 【0005】

##### 【非特許文献1】

Cell 60: 509, 1990

##### 【非特許文献2】

Nature 343: 774, 1990

##### 【非特許文献3】

Int. Rev. Cytol. 181: 151, 1998

##### 【非特許文献4】

Int. J. Hematol 76: 127, 2002

##### 【非特許文献5】

Science 274: 94, 1996

##### 【非特許文献6】

J. Immunol. Methods 110: 29, 1988

##### 【非特許文献7】

J. Immunol. Methods 210: 195, 1997

**【非特許文献8】**

Br. J. Cancer 77: 1907, 1998

**【非特許文献9】**

J. Immunother. 24: 66, 2001

**【非特許文献10】**

Hum. Gene. Ther. 13: 569, 2002

**【0006】****【発明が解決しようとする課題】**

本発明の目的は、WT1特異的CTL前駆細胞の頻度を指標とした、WT1ワクチン応答性が高い患者の選択方法などを提供することにある。

**【0007】****【課題を解決するための手段】**

本発明者は、WT1由来の癌抗原ペプチドを用いてHLAテトラマーを作製し、造血器悪性腫瘍及び肺癌の患者のワクチン投与前のCTL前駆細胞の頻度を測定したところ、驚くべきことに、健常人に比べて、従来にない高い頻度でCTL前駆細胞（WT1特異的なCTL前駆細胞）が存在していることを見出した。このことから癌抗原WT1に関しては、WT1特異的なCTL前駆細胞の頻度を指標として、WT1ワクチン応答性が高い患者の選択やWT1ワクチンの標的分子の同定を行えることが明らかとなつた。

本発明は、以上のような知見に基づき完成するに至ったものである。

**【0008】**

すなわち本発明は、

(1) 以下の工程 (a)、(b) および (c) :

(a) CTL前駆細胞を含む生体試料を被験患者より単離する工程、

(b) 前記 (a) の生体試料中に存在するWT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を測定する工程、

(c) 前記 (b) の測定結果に基づいてWT1ワクチン応答性を判断する工程、を含む、WT1ワクチン応答性が高い患者の選択方法；

(2) WT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を、HLAテトラマ

一法、エリススポット法、リアルタイムR T - P C R法および限界希釈法のいずれかの方法により測定する、前記（1）記載の選択方法；

（3） H L Aテトラマー法により測定する、前記（2）記載の選択方法；

（4） 以下の工程（a）、（b）、（c）および（d）：

（a） C T L前駆細胞を含む生体試料を被験患者より単離する工程、

（b） W T 1由来の癌抗原ペプチドを含有するH L Aテトラマーと、前記（a）の生体試料とを接触させる工程、

（c） H L Aテトラマーに結合したW T 1特異的なC T L前駆細胞の存在頻度または量を測定する工程、

（d） 前記（c）の測定結果に基づいてW T 1ワクチン応答性を判断する工程、を含む、前記（3）記載の選択方法；

（5） 前記（4）に記載の工程（c）が、C D 8陽性またはC D 8／C D 3陽性のC T L前駆細胞中でのH L Aテトラマー結合細胞の割合を測定することにより行われる、前記（4）記載の選択方法；

（6） H L Aテトラマーの構成成分であるH L A抗原がH L A-A 2 4抗原またはH L A-A 2抗原である、前記（4）または（5）記載の選択方法、

（7） W T 1由来の癌抗原ペプチドが、Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu（配列番号：2）、Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu（配列番号：3）、Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu（配列番号：4）およびArg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe（配列番号：5）より選択される、前記（4）～（6）いずれか記載の選択方法；

（8） フローサイトメトリーを用いて行われる前記（1）～（7）いずれか記載の選択方法；

（9） W T 1特異的なC T L前駆細胞の存在頻度または量が、健常人の値と比較して1.5倍以上高いことを指標としてW T 1ワクチン応答性を判断する、前記（1）～（8）いずれか記載の選択方法；

（10） 以下の工程（a）～（d）：

（a） C T L前駆細胞を含む生体試料を被験患者より単離する工程、

（b） 前記（a）の生体試料に複数のW T 1ワクチンの標的分子をそれぞれ適用

し、

(c) 前記(b)の生体試料中それぞれに存在するWT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を測定し、それぞれ比較する工程、

(d) 前記(c)の測定結果に基づいて、その患者に有効なWT1ワクチンの標的分子を同定する工程、

を含む、患者固有のWT1ワクチン標的分子の同定方法。

#### 【0009】

(11) WT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を、HLAテトラマー法、エリススポット法、リアルタイムRT-PCR法および限界希釈法のいずれかの方法により測定する、前記(10)記載の同定方法；

(12) HLAテトラマー法により測定する、前記(11)記載の同定方法；

(13) 以下の工程(a)～(d)：

(a) CTL前駆細胞を含む生体試料を被験患者より単離する工程、

(b) WT1由来の複数の癌抗原ペプチドを含有する複数のHLAテトラマーと、前記(a)の生体試料とをそれぞれ接触させる工程、

(c) HLAテトラマーに結合したWT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量をそれぞれ測定し、比較する工程、

(d) 前記(c)の測定結果に基づいて、その患者に有効なWT1由来の癌抗原ペプチドを同定する工程、

を含む、前記(12)記載の同定方法；

(14) 前記(13)に記載の工程(c)が、CD8陽性またはCD8/CD3陽性のCTL前駆細胞中でのHLAテトラマー結合細胞の割合を測定することにより行われる、前記(13)記載の同定方法；

(15) HLAテトラマーの構成成分であるHLA抗原がHLA-A24抗原またはHLA-A2抗原である、前記(13)または(14)記載の同定方法；

(16) WT1由来の癌抗原ペプチドが、Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu(配列番号：2)、Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu(配列番号：3)、Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu(配列番号：4)およびArg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe(配列番号：5)より選択される、前記(13)～(1

5) いずれか記載の同定方法；

(17) フローサイトメトリーにより行われる前記(10)～(16)いずれか記載の同定方法；

(18) WT1由来の癌抗原ペプチドを含有するHLAテトラマーを成分とする、WT1ワクチン応答性が高い患者の選択のための臨床検査薬；

(19) HLAテトラマーの構成成分であるHLA抗原がHLA-A24抗原またはHLA-A2抗原である、前記(18)記載の臨床検査薬；

(20) WT1由来の癌抗原ペプチドが、Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu(配列番号：2)、Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu(配列番号：3)、Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu(配列番号：4)およびArg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe(配列番号：5)より選択される、前記(18)または(19)に記載の臨床検査薬；

(21) 前記(18)～(20)いずれか記載の臨床検査薬を含有するキット；ならびに

(22) 前記(10)～(17)いずれか記載の患者固有のWT1ワクチン標的分子の同定方法により同定された標的分子を含有する、患者固有の癌を処置するための当該患者用の医薬組成物；に関する。

### 【0010】

#### 【発明の実施の形態】

本発明は、以下の工程(a)、(b)および(c)：

(a) CTL前駆細胞を含む生体試料を被験患者より単離する工程、

(b) 前記(a)の生体試料中に存在するWT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を測定する工程、

(c) 前記(b)の測定結果に基づいてWT1ワクチン応答性を判断する工程、を含む、WT1ワクチン応答性が高い患者の選択方法を提供する。

### 【0011】

本発明においては、ワクチン投与前の癌患者において、従来にない高い頻度でWT1特異的なCTL前駆細胞が存在していることを見出した。従ってWT1特異的なCTL前駆細胞の量や頻度を指標として、WT1ワクチン応答性が高い患者の選択を行う

ことができる。

#### 【0012】

工程（a）における被験患者とは、癌の疑われる患者、若しくは癌患者を指す。具体的には、白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫などの血液性の癌や、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等の固形癌が疑われる患者、若しくはこれらの癌に罹患した患者が例示される。

#### 【0013】

工程（a）において被験患者より単離される生体試料は、CTL前駆細胞を含む限り特に制限はないが、血液、リンパ液またはこれらの培養物、血液から単離した末梢血単核球（PBMC）、若しくはT細胞が浸潤した組織などが例示される。生体試料は、そのまま使用することもできるし、希釀または濃縮して使用することもできる。好ましくはPBMCが用いられ、当該PBMCは通常のFicoll-Hypaqueの密度勾配遠心法などにより単離することができる。

#### 【0014】

工程（b）において生体試料中に存在するWT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を測定する手法は、CTLの存在頻度または量を測定できる従来公知の如何なる手法を用いても良い。具体的には、例えばHLAテトラマー法、エリスポート法、リアルタイムRT-PCR法または限界希釀法などを用いることができる。

#### 【0015】

ここでHLAテトラマー法とは、HLA抗原 $\alpha$ 鎖と $\beta$ 2ミクログロブリンを目的抗原ペプチドと会合させた複合体（HLAモノマー）をビオチン化し、蛍光標識したアビジンに結合させることにより4量体化して作製したHLAテトラマーを用いて、抗原ペプチド特異的CTLを検出する方法である。具体的には、当該HLAテトラマーで抗原ペプチド特異的なCTLを染色し、フローサイトメーターで解析することにより当該CTLを定量することができる。このようなHLAテトラマーの製造方法およびそれを用いたCTLの検出方法は公知であり、例えば文献（Science 274: 94, 1996）に記載の方法に準じて行うことができる。

### 【0016】

エリススポット法とは、活性化CTLが産生するIFN- $\gamma$ 、GM-CSF等のサイトカインに対する抗体をプレート上に固相化し、目的抗原若しくは目的抗原ペプチドで刺激した生体試料をプレートに添加し、前記固相化抗体に結合した生体試料中の活性化CTLが分泌したサイトカインを抗サイトカイン抗体でスポットとして検出すことにより、生体試料中のCTLを検出する方法である。当該エリススポット法を用いたCTLの定量法は公知であり、例えば文献 (J. Immunol. Methods 110: 29, 1988) に記載の方法に準じて行うことができる。

### 【0017】

リアルタイムRT-PCR法とは、活性化CTLが産生するIFN- $\gamma$ 、GM-CSF等のサイトカインの遺伝子量をRT-PCRにより測定することにより、間接的に、目的抗原若しくは目的抗原ペプチド反応性のCTL頻度を測定する方法である。当該リアルタイムRT-PCR法を用いたCTLの定量法は公知であり、例えば文献 (J. Immunol. Methods 210: 195, 1997) に記載の方法に準じて行うことができる。

### 【0018】

限界希釈法とは、CTLを含む生体試料を細胞密度を変えてプレートに播種し、目的抗原若しくは目的抗原ペプチドで刺激しながら培養して、活性化CTLが産生するサイトカイン量や細胞傷害性を測定し、陽性ウェル数からCTL頻度を測定する方法である。当該限界希釈法を用いたCTLの定量法は公知であり、例えば文献 (Br. J. Cancer 77: 1907, 1998) に記載の方法に準じて行うことができる。

以上のような公知のCTL定量法を用いることにより、WT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を測定することができる。

### 【0019】

工程 (c) におけるWT1ワクチン応答性の判断は、工程 (b) で得られた被験患者におけるWT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量（以下被験患者値という）を、健常人のそれ（健常人値）と比較し、両者の違いを判定することによって行うことができる。この場合、健常人から単離・調製した生体試料（血液、リンパ液、PBMC等）が必要であるが、これらは癌に罹患していない人の生体試料を採取することによって、取得することができる。なお、ここでいう「健常人」と

は、癌と診断されていない人をいう。

#### 【0020】

被験者値と健常人値との比較は、被験者の生体試料と健常人の生体試料を対象とした測定を並行して行うことで実施できる。並行して行わない場合は、複数（少なくとも2つ、好ましくは3以上、より好ましくは5以上）の健常人の生体試料を用いて均一な測定条件で測定して得られた健常人値の平均値または統計的中間値を比較に用いることができる。

#### 【0021】

被験患者においてWT1ワクチン応答性が高いか否かの判断は、被験者値が健常人値と比較して1.5倍以上、好ましくは2倍以上多いことを指標として行うことができる。すなわち、被験者値が健常人値と比較して1.5倍以上、好ましくは2倍以上多ければ、WT1ワクチン応答性が高いと判断する。WT1ワクチン応答性が高いと判断された患者は、WT1ワクチンが適用可能、即ちWT1ワクチンによる治療を良好に適用できると判断される。

#### 【0022】

前記CTLの測定法のうち、手法の容易さおよび精度の観点から最も好ましいのはHLAテトラマー法である。すなわち本発明の選択方法の好ましい形態として、本発明は、HLAテトラマー法を用いることを特徴とするWT1ワクチン応答性が高い患者の選択方法を提供する。

#### 【0023】

当該HLAテトラマーを用いたWT1ワクチン応答性が高い患者の選択方法は、具体的には以下の工程（a）、（b）、（c）および（d）：

- （a）CTL前駆細胞を含む生体試料を被験患者より単離する工程、
- （b）WT1由来の癌抗原ペプチドを含有するHLAテトラマーと、前記（a）の生体試料とを接触させる工程、
- （c）HLAテトラマーに結合したWT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を測定する工程、
- （d）前記（c）の測定結果に基づいてWT1ワクチン応答性を判断する工程、を含むものである。

### 【0024】

ここで工程（a）における「生体試料」および「被験患者」は、前記した通りである。

工程（b）において用いられる「HLAテトラマー」とは、HLA抗原の $\alpha$ 鎖と $\beta$ 2ミクログロブリンをペプチド（抗原ペプチド）と会合させた複合体（HLAモノマー）をビオチン化し、アビジンに結合させることにより4量体化したものを指す（Science 279: 2103-2106(1998)、Science 274: 94-96 (1996)）。当該HLAテトラマーは、フローサイトメトリー、蛍光顕微鏡等の公知の検出手段により結合したCTL前駆細胞を容易に選別または検出することが出来るように、蛍光標識されていることが好ましい。具体的には、例えばフィコエリスリン（PE）、フルオレスцинインソチオシアネート（FITC）、ペリジニンクロロフィルプロテイン（PerCP）などにより標識されたHLAテトラマーが挙げられる。

### 【0025】

前記HLAテトラマーの成分として用いられるWT1由来の癌抗原ペプチドは、ヒトWT1（Cell, 60:509, 1990、NCBIデータベースAccession No.XP\_034418、配列番号：1）に由来し、HLA抗原と複合体を形成してHLA拘束性の細胞傷害性T細胞（CTL）の誘導活性（免疫原性）を有するものである。

### 【0026】

HLA分子には多くのサブタイプが存在し、結合できる癌抗原ペプチドのアミノ酸配列にはそれぞれのタイプについて規則性（結合モチーフ）が存在することが知られている（Immunogenetics, 41, p178, 1995、J. Immunol., 155:p4749, 1995）。例えばHLA-A24の場合、8~11アミノ酸からなるペプチドのうちの第2位のアミノ酸がチロシン（Tyr）、フェニルアラニン（Phe）、メチオニン（Met）またはトリプトファン（Trp）であり、C末端のアミノ酸がフェニルアラニン（Phe）、ロイシン（Leu）、イソロイシン（Ile）、トリプトファン（Trp）またはメチオニン（Met）となることが知られている（J. Immunol., 152, p3913, 1994、Immunogenetics, 41, p178, 1995、J. Immunol., 155, p4307, 1994）。

またHLA-A2のモチーフについては、以下の表1に示したモチーフが知られている（Immunogenetics, 41, p178, 1995、J. Immunol., 155:p4749, 1995）。

## 【0027】

【表1】

HLA-A2のタイプ	N末端から2番目のアミノ酸	C末端のアミノ酸
HLA-A0201	L, M	V, L
HLA-A0204	L	L
HLA-A0205	V, L, I, M	L
HLA-A0206	V, Q	V, L
HLA-A0207	L	L

(ペプチドの長さは8~11アミノ酸)

## 【0028】

さらに近年、HLA抗原に結合可能と予想されるペプチド配列を、インターネット上、NIHのBIMASのソフトを使用することにより検索することができる ([http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla\\_bind/](http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind/) )。またBIMAS HLA peptide binding prediction analysis (J. Immunol., 152, 163, 1994) を用いて検索することも可能である。このようにして検索・同定されたWT1由来ペプチドの具体例としては、例えば国際公開第2000/18795号パンフレットのTableII～TableXLVIに列挙されたペプチドが挙げられる。

以上のようなWT1由来のペプチドは、そのアミノ酸残基の一部に改変（置換、欠失、及び／又は付加（ペプチドのN末端、C末端へのアミノ酸の付加も含む））を有していても良く、好ましくはアミノ酸残基の置換が挙げられる。当該置換は前記モチーフ上とり得るアミノ酸残基への置換が望ましい。

## 【0029】

以上のようなWT1由来のペプチド（改変体も含む）を、公知の癌抗原ペプチドのアッセイ法（例えばW0 02/47474号公報、Int J. Cancer: 100, 565-570 (2002) 等参照）に供することにより、WT1由来の癌抗原ペプチドを選択することができる。

## 【0030】

WT1由来の癌抗原ペプチドの具体例としては、例えば以下のペプチドが例示される：

Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：2)

Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：3)

Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号：4)

Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (配列番号：5)

Ser Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：6)

Ala Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：7)

Abu Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：8)

Arg Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：9)

Lys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：10)

### 【0031】

Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu (配列番号：11)

Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu (配列番号：12)

Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu (配列番号：13)

Asn Tyr Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu (配列番号：14)

Arg Val Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu (配列番号：15)

Arg Tyr Pro Ser Ser Gln Lys Lys Phe (配列番号：16)

Arg Tyr Pro Ser Ala Gln Lys Lys Phe (配列番号：17)

Arg Tyr Pro Ser Abu Gln Lys Lys Phe (配列番号：18)

(ここでAbuは $\alpha$ -アミノ酪酸である)

### 【0032】

このうち配列番号：2および配列番号：4に記載のペプチドはHLA-A24抗原およびHLA-A2抗原に結合性のペプチドであり、またそれ以外のペプチド（配列番号：3、5、6～18）はHLA-A24抗原に結合性のペプチドである。

好ましくは、前記配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4 および配列番号：5のいずれかに記載の癌抗原ペプチドが挙げられる。

### 【0033】

前記ペプチドは、1つのHLAテトラマー中に2種以上含有されていてもよい。

### 【0034】

前記ペプチドは、通常のペプチド化学において用いられる方法に準じて合成す

ることができる。合成方法としては、文献（ペプタイド・シンセシス（Peptide Synthesis），Interscience, New York, 1966；ザ・プロテインズ（The Proteins），Vol 2，Academic Press Inc.，New York, 1976；ペプチド合成，丸善（株），1975；ペプチド合成の基礎と実験、丸善（株），1985；医薬品の開発 続 第14巻・ペプチド合成，広川書店，1991）などに記載されている方法が挙げられる。

### 【0035】

前記ペプチドは、そのN末端アミノ酸のアミノ基またはC末端アミノ酸のカルボキシル基を修飾したペプチドであってもよい。

ここでN末端アミノ酸のアミノ基の修飾基としては、例えば1～3個の炭素数1から6のアルキル基、フェニル基、シクロアルキル基、アシル基が挙げられ、具体的には炭素数1から6のアルカノイル基、フェニル基で置換された炭素数1から6のアルカノイル基、炭素数5から7のシクロアルキル基で置換されたカルボニル基、炭素数1から6のアルキルスルホニル基、フェニルスルホニル基、炭素数2から6のアルコキシカルボニル基、フェニル基で置換されたアルコキシカルボニル基、炭素数5から7のシクロアルコキシで置換されたカルボニル基、フェノキシカルボニル基等が挙げられる。

### 【0036】

C末端アミノ酸のカルボキシル基の修飾基としては、例えばエステル基およびアミド基が挙げられ、エステル基の具体例としては、炭素数1から6のアルキルエ斯特基、フェニル基で置換された炭素数0から6のアルキルエ斯特基、炭素数5から7のシクロアルキルエ斯特基等が挙げられ、アミド基の具体例としては、アミド基、炭素数1から6のアルキル基1つまたは2つで置換されたアミド基、フェニル基で置換された炭素数0から6のアルキル基1つまたは2つで置換されたアミド基、アミド基の窒素原子を含んで5から7員環のアザシクロアルカンを形成するアミド基等が挙げられる。

### 【0037】

HLAテトラマーの成分であるHLA抗原（HLA抗原の $\alpha$ 鎖）は、如何なるサブタイプのHLA抗原であっても用いることができるが、診断または選択対象のサブタイ

プと同じサブタイプを用いる必要がある。具体的には、例えばHLA-A24抗原またはHLA-A2抗原が挙げられる。これらHLA抗原の塩基配列およびアミノ酸配列は公知であり、例えばHLA-A24抗原については Cancer Res., 55: 4248-4252 (1995) および Genbank Accession No.M64740に開示されている。またHLA-A2抗原については Genbank Accession No.M84379に開示されている。従ってこれら公知の塩基配列の情報に基づき、PCR法等の常法により、容易にHLA抗原の $\alpha$ 鎖をクローニングすることができる。

#### 【0038】

当該HLA抗原の $\alpha$ 鎖は、CTLの結合性や選別性を容易にするために可溶性断片であることが好ましい。さらに、ビオチン-アビジン結合により4量体化するために、当該HLA抗原 $\alpha$ 鎖のC末端はビオチン化可能な構造を有していること、すなわちビオチン結合部位が付加されていることが好ましい。

具体的には、例えばHLA-A2402 (HLA-A24の1種) の場合は、正プライマー：5'-CCATGGGCAGCCATTCTATGCGCTATTTTCTACCTCCGT-3' (配列番号：19) および逆向きプライマー：5'-GGATCCTGGCTCCCATCTCAGGGTGAGGGGCTGGGCAGACCCTC-3' (配列番号：20) を用いて、HLA-A\*2402 (GenBank Acc. No. M64740) 発現プラスミドを鋳型とし、PCR反応を行うことにより、C末端タグ中の特異的リジン残基をBirA酵素でビオチニル化可能なように設計された組換え可溶性HLA-A\*2402 $\alpha$ 鎖のcDNAを得ることができる。

#### 【0039】

HLAテトラマーの成分である $\beta$ 2ミクログロブリンは、ヒト由来の $\beta$ 2ミクログロブリンが好ましい。当該ヒト由来の $\beta$ 2ミクログロブリンのcDNAは、正プライマー：5'-CATATGATCCAGCGTACCCCGAAAATTCAAG-3' (配列番号：21) および逆向きプライマー：5'-GGATCCTTACATGTCTCGATCCACTAAC-3' (配列番号：22) を用いて、ヒト $\beta$ 2ミクログロブリン (GenBank Acc. No. AB021288) 発現プラスミドを鋳型とし、PCR反応を行うことなどにより得ることができる。

#### 【0040】

HLAテトラマーの成分であるアビジンは、従来公知の如何なるアビジンであっても使用することができるが、フローサイトメトリーや蛍光顕微鏡等による検出

を容易にするために、蛍光標識されていることが好ましい。蛍光色素は、公知のものを制限なく使用することができ、例えばフィコエリスリン（PE）、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、ペリジニンクロロフィルプロテイン（PerCP）などが挙げられる。

#### 【0041】

以上のHLAテトラマーの成分を含有するHLAテトラマーの作製法については、文献（Science 279: 2103-2106(1998)、Science 274: 94-96 (1996)等）により周知であるが、簡単に述べると以下のようになる。

まずタンパク質を発現可能な大腸菌や哺乳動物細胞に、HLA  $\alpha$ 鎖発現ベクターおよび $\beta$ 2ミクログロブリン発現ベクターを導入し発現させる。ここでは大腸菌（例えばBL21）を用いることが好ましい。得られた単量体HLA複合体と抗原ペプチド（WT1由来の癌抗原ペプチド）とを混合し、可溶性のHLA-ペプチド複合体を形成させる。次にHLA-ペプチド複合体におけるHLA  $\alpha$ 鎖のC末端部位の配列をBirA酵素によりビオチン化する。このビオチン化されたHLA-ペプチド複合体と蛍光標識されたアビジンとを4:1のモル比で混合することにより、HLAテトラマーを調製することができる。なお、前記各ステップにおいて、ゲルろ過等によるタンパク精製を行うことが好ましい。

#### 【0042】

前記工程（b）は、以上のようにして作製されたHLAテトラマーと、生体試料（被験患者より単離されたCTL前駆細胞を含む生体試料）とを接触させることにより行われる。当該接触は37°Cで行うことが好ましい。また接触は、通常の生理的緩衝液、例えば血清を含むリン酸緩衝生理食塩水（PBS）中において行なうことが好ましい。

なお、HLAテトラマーの代わりに蛍光標識したストレプトアビジンを添加して同様の処理を行った陰性対照も、併せて作製しておくことが好ましい。

#### 【0043】

工程（b）の後、HLAテトラマーに結合したWT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を測定する（工程c）。当該測定は、従来公知の如何なる手法を用いて行っても良い。HLAテトラマーが蛍光標識されている場合、このHLAテトラマー

に結合したCTL前駆細胞は蛍光標識されていることになるので、フローサイトメーター、蛍光顕微鏡などを用いて標識されたCTLを検出若しくは単離することができる。

#### 【0044】

HLAテトラマーに結合したWT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度は、例えば、CD8陽性細胞（CD8陽性のCTL前駆細胞）、またはCD8/CD3陽性細胞（CD8/CD3陽性のCTL前駆細胞）に対する前記HLAテトラマー結合細胞の割合（頻度）を測定することにより求めることができる。

ここでCD8陽性細胞は、例えば蛍光標識したマウス抗ヒトCD8モノクローナル抗体を用いて標識・検出することができる。またCD3陽性細胞は蛍光標識したマウス抗ヒトCD3モノクローナル抗体を用いて標識・検出することができる。

ここで用いる蛍光色素は、HLAテトラマーにおいて用いられる蛍光色素と異なるものを用いる必要がある。すなわち、PE標識したHLAテトラマーを用いる場合は、FITC標識したマウス抗ヒトCD8モノクローナル抗体、およびPerCP標識したマウス抗ヒトCD3モノクローナル抗体を用いるというように、蛍光色素を区別する必要がある。

#### 【0045】

具体的な操作は、CD8陽性細胞に対するHLAテトラマー結合細胞の割合を測定する場合は、例えばPE標識HLAテトラマーと生体試料とを接触させた後、FITC標識マウス抗ヒトCD8モノクローナル抗体をさらに添加して反応させ、染色された細胞をフローサイトメーターや蛍光顕微鏡で解析する。CD8陽性細胞（CD8<sup>+</sup>）を選択し、その中のテトラマー陽性細胞（CD8<sup>+</sup>tetramer<sup>+</sup>）の割合から陰性対照のアビジン陽性細胞（CD8<sup>+</sup>avidin<sup>+</sup>）の割合を差し引いた数値を、WT1抗原ペプチド特異的CTL前駆細胞の割合とすることができる（以下）：

WT1抗原ペプチド特異的CTL前駆細胞（%）＝

$$[(\text{CD8}^+ \text{tetramer}^+ \text{細胞数} / \text{CD8}^+ \text{細胞数}) - (\text{CD8}^+ \text{avidin}^+ \text{細胞数} / \text{CD8}^+ \text{細胞数})] \times 100$$

#### 【0046】

また、CD3陽性・CD8陽性細胞に対するHLAテトラマー結合細胞の割合を測定す

る場合は、例えばPE標識HLAテトラマーと生体試料とを接触させた後、FITC標識マウス抗ヒトCD8モノクローナル抗体及びPerCP標識マウス抗ヒトCD3抗体をさらに添加して反応させ、染色された細胞をフローサイトメーターや蛍光顕微鏡で解析する。CD3陽性およびCD8陽性細胞（CD3+CD8+）を選択し、その中のテトラマー陽性細胞（CD3+CD8+tetramer+）の割合から陰性対照のアビジン陽性細胞（CD3+CD8+avidin+）の割合を差し引いた数値を、WT1抗原ペプチド特異的CTL前駆細胞の割合とすることができる（以下）：

WT1抗原ペプチド特異的CTL前駆細胞（%）＝

$$[(\text{CD3+CD8+tetramer+細胞数} / \text{CD3+CD8+細胞数}) - (\text{CD3+CD8+avidin+細胞数} / \text{CD3+CD8+細胞数})] \times 100$$

#### 【0047】

以上の測定結果に基づき、WT1ワクチン応答性を判断する。具体的には、工程（b）で得られた被験患者におけるWT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量（以下被験患者値という）を、健常人のそれ（健常人値）と比較し、両者の違いを判定することによって行うことができる。この場合、健常人から単離・調製した生体試料（血液、リンパ液、PBMC等）が必要であるが、これらは癌に罹患していない人の生体試料を採取することによって、取得することができる。なお、ここでいう「健常人」とは、癌と診断されていない人をいう。

#### 【0048】

被験者値と健常人値との比較は、被験者の生体試料と健常人の生体試料を対象とした測定を並行して行うことで実施できる。並行して行わない場合は、複数（少なくとも2つ、好ましくは3以上、より好ましくは5以上）の健常人の生体試料を用いて均一な測定条件で測定して得られた健常人値の平均値または統計的中間値を比較に用いることができる。

#### 【0049】

被験患者においてWT1ワクチン応答性が高いか否かの判断は、被験者値が健常人値と比較して1.5倍以上、好ましくは2倍以上多いことを指標として行うことができる。すなわち、被験者値が健常人値と比較して1.5倍以上、好ましくは2倍以上多ければ、WT1ワクチン応答性が高いと判断する。WT1ワクチン応答性が高いと

判断された患者は、WT1ワクチンが適用可能、即ちWT1ワクチンによる治療を良好に適用できると判断される。

以上のような本発明の患者の選択方法は、ワクチン投与前の患者の診断のみならず、ワクチン治療後の診断や効能の確認にも使用することができる。

#### 【0050】

本発明はまた、以下の工程（a）－（d）：

- (a) CTL前駆細胞を含む生体試料を被験患者より単離する工程、
  - (b) 前記(a)の生体試料に複数のWT1ワクチンの標的分子をそれぞれ適用し、
  - (c) 前記(b)の生体試料中それぞれに存在するWT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を測定し、それぞれ比較する工程、
  - (d) 前記(c)の測定結果に基づいて、その患者に有効なWT1ワクチンの標的分子を同定する工程、
- を含む、患者固有のWT1ワクチン標的分子の同定方法を提供する。

#### 【0051】

本発明においては、ワクチン投与前の癌患者において、従来にない高い頻度でWT1特異的なCTL前駆細胞が存在していることを見出した。従ってWT1特異的なCTL前駆細胞の量や頻度を指標として、患者固有のWT1ワクチンの標的分子（治療用の標的分子）の同定を行うことができる。

すなわち前記標的分子の同定方法は、WT1ワクチン応答性が高いと判断された患者に対して治療上最適の標的分子（抗原ペプチド）を同定するために、有効に用いられる。

具体的には、前記WT1ワクチン応答性が高い患者の選択方法と同様に、HLAテトラマー法、エリスポット法、リアルタイムRT-PCR法または限界希釈法等により、WT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を測定することにより行われる。好ましくはHLAテトラマー法が用いられる。

#### 【0052】

HLAテトラマー法は、以下の工程（a）、（b）、（c）および（d）：

- (a) CTL前駆細胞を含む生体試料を被験患者より単離する工程、

(b) WT 1 由来の複数の癌抗原ペプチドを含有する複数の HLA テトラマーと、前記 (a) の生体試料とをそれぞれ接触させる工程、  
(c) HLA テトラマーに結合した WT 1 特異的な CTL 前駆細胞の存在頻度または量をそれぞれ測定し、比較する工程、  
(d) 前記 (c) の測定結果に基づいて、その患者に有効な WT 1 由来の癌抗原ペプチドを同定する工程、  
を含んで行われる。

#### 【0053】

具体的にはまず、候補となる WT 1 由来癌抗原ペプチドを含有する HLA テトラマーを複数作製する。そして、それぞれの HLA テトラマーと被験患者より単離した生体試料とを接触させ、HLA テトラマーに結合した WT 1 特異的な CTL 前駆細胞の存在頻度または量を測定する。各 HLA テトラマーについての測定結果を比較し、最も高い値を示した HLA テトラマーが含有する癌抗原ペプチド（すなわち、最も CTL に認識されやすい癌抗原ペプチド）を、その患者に対する WT 1 ワクチン治療のための標的分子、即ち患者固有の標的分子として同定する。

#### 【0054】

ここで用いる癌抗原ペプチドは、WT 1 に由来する癌抗原ペプチドであれば如何なるものであっても良いが、例えば配列番号：2～18 に記載の癌抗原ペプチドが挙げられる。好ましくは配列番号：2～5 のいずれかに記載の癌抗原ペプチドが挙げられる。

なお、各工程の具体的な手法や成分の調製法などについては、前述の WT 1 ワクチン応答性が高い患者の選択方法の項を参照されたい。

本発明の WT 1 ワクチン標的分子の同定方法によれば、患者固有の癌を処置できる標的分子が同定される。よって、本発明は別の態様として、本発明の同定方法により同定された患者固有の WT 1 ワクチン標的分子を含有する、患者固有の癌を処置するための当該患者用の医薬組成物を提供する。本発明の医薬組成物には癌ワクチンが含まれ、当業者に周知のアジュバント等を含有することができる。

#### 【0055】

本発明はまた、WT1由来の癌抗原ペプチドを含有するHLAテトラマーを成分とする、WT1ワクチン応答性が高い患者の選択のための臨床検査薬を提供する。

本発明の臨床検査薬の成分となるHLAテトラマーは、前述のようにHLA抗原の $\alpha$ 鎖と $\beta$ 2ミクログロブリンをWT1由来の癌抗原ペプチドと会合させた複合体（HLAモノマー）をビオチン化し、アビジンに結合させることにより4量体化したものを目指す（Science 279: 2103-2106(1998)、Science 274: 94-96 (1996)）。

#### 【0056】

ここで用いる癌抗原ペプチドは、WT1に由来する癌抗原ペプチドであれば如何なるものであっても良いが、例えば配列番号：2～18に記載の癌抗原ペプチドが挙げられる。好ましくは配列番号：2～5のいずれかに記載の癌抗原ペプチドが挙げられる。

当該HLAテトラマーの各成分の調製法やHLAテトラマーの作製法については、前述のWT1ワクチン応答性が高い患者の選択方法の項に記載したとおりである。

#### 【0057】

本発明の臨床検査薬は、WT1ワクチン応答性が高い患者の選択のためのキットの1成分とすることができます。当該キットは、前記本発明の臨床検査薬のみからなるキットであっても、また本発明の臨床検査薬と他の成分とを含むキットであっても良い。当該キット中の他の成分としては、蛍光標識ストレプトアビジン、蛍光標識マウス抗ヒトCD8モノクローナル抗体、蛍光標識マウス抗ヒトCD3モノクローナル抗体などが挙げられる。ここで蛍光色素としては、フィコエリスリン（PE）、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）、ペリジニンクロロフィルプロテイン（PerCP）などが挙げられる。

#### 【0058】

本発明の臨床検査薬およびキットは、WT1ワクチン応答性が高い患者の選択に使用できる他、WT1ワクチンの標的分子（治療用の標的分子）の選択にも使用することができる。

#### 【0059】

##### 【実施例】

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に

よりなんら限定されるものではない。

### 【0060】

#### 実施例1

##### 末梢血単核球の調製

HLA-A<sup>\*</sup>2402陽性の癌患者とHLA-A<sup>\*</sup>2402陽性の健常人からインフォームドコンセントを取得した後、採血をおこなった。造血器悪性腫瘍患者は18名で、その内訳は急性骨髓性白血病（AML）患者11名、急性リンパ性白血病（ALL）患者2名、慢性骨髓性白血病（CML）患者1名、骨髓異形成症候群（MDS）患者4名であった。肺癌患者は7名、HLA-A<sup>\*</sup>2402陽性の健常人は10名であった。

造血器悪性腫瘍患者は、診断時または治療経過において、骨髓および末梢血検体についてWT1遺伝子の有意な高発現が1回以上確認されている。また肺癌患者は、生体検体または摘出標本でWT1遺伝子の高発現が確認されている。

採取した血液からFicoll-Hypaqueの密度勾配遠心法により末梢血単核球（PBMC）を分離し、液体窒素中で凍結保存した。

### 【0061】

#### 実施例2

##### HLAテトラマーの調製

WT1タンパク質の235番目から243番目の9アミノ酸から成るペプチド（配列番号：2）を用い、文献（Int. J. Cancer: 100, 565-570, 2002）に記載の方法により蛍光色素Phycoerythrin（PE）で標識したHLA-A<sup>\*</sup>2402のテトラマーを作製した。

### 【0062】

まず、組換え可溶性HLA-A<sup>\*</sup>2402のcDNAを増幅するため、下記正プライマー：5'-CCATGGGCAGCCATTCTATGCGCTATTTTCTACCTCCGT-3'（配列番号：19）および逆向きプライマー：5'-GGATCCTGGCTCCCATCTCAGGGTGAGGGGCTTGGCAGACCCTC-3'（配列番号：20）を用いて、HLA-A<sup>\*</sup>2402（GenBank Acc. No. M64740）発現プラスミドを鋳型とし、PCRを行った。逆向きプライマーは、C末端でフレームが一致するようにBirA認識配列をコードしている。増幅した断片を制限酵素NcoIおよびBamH1で切断し、pET11dベクター（Novagen社）にクローニングした。

次に、組換えヒトβ2ミクログロブリンのcDNAを増幅するため、下記正プ

ライマー：5'-CATATGATCCAGCGTACCCGAAAAATTCAAG-3'（配列番号：21）および逆向きプライマー：5'-GGATCCTTACATGTCTCGATCCCACTTAAC-3'（配列番号：22）を用いて、ヒト $\beta$ 2ミクログロブリン（GenBank Acc. No. AB021288）発現プラスミドを鋳型とし、PCRを行った。増幅した断片を制限酵素NdeIおよびBamH1で切断し、pET11aベクター（Novagen社）にクローニングした。

### 【0063】

前記2種類のベクターを大腸菌BL21で発現させ、インクルージョンボディーの不溶画分として回収した。それぞれのインクルージョンボディーは8M尿素溶液で溶解後、リフォールディングバッファーで希釈し、更にペプチド（配列番号：2）を添加して可溶性のHLA-ペプチド複合体を形成させた。次にHLA-ペプチド複合体のC末端部位の配列をBirA酵素によりビオチン化し、ゲルろ過法でビオチン化されたHLA-ペプチド複合体を精製した。ビオチン化されたHLA-ペプチド複合体とPE標識されたアビジン（Molecular Probe社）を4:1のモル比で混合して、HLAテトラマーを調製した。

### 【0064】

#### 実施例3

##### WT1特異的CTL前駆細胞のHLAテトラマーによる解析

実施例1の凍結したPBMCを解凍した直後に0.5%ウシ胎児血清（FCS）を含むリン酸緩衝生理食塩水（PBS）に $1 \times 10^6$ 個/mlで再浮遊し、実施例2で調製したテトラマー溶液（500 $\mu$ g/ $\mu$ l）2 $\mu$ lを加え、37°Cで30分間インキュベートした。陰性対照として、テトラマーの代わりにPE標識したストレプトアビジン（Becton Dickinson社）を添加し、同様に処理をした検体も用意した。その後氷上で急冷し、FITC標識マウス抗ヒトCD8モノクローナル抗体（BD Pharmigen社）及びPerCP標識マウス抗ヒトCD3抗体（BD Pharmigen社）を各15 $\mu$ l添加して、4°Cで30分間インキュベートした。染色した細胞は、0.5%FCSを含むPBSで2回遠心洗浄した後、フローサイトメーターFACSort（Becton Dickinson社）で解析した。CD3陽性及びCD8陽性の細胞（CD3+CD8+）を選択し、その選択した細胞中のテトラマー陽性細胞（CD3+CD8+tetramer+）の割合（頻度）から陰性対照のPE標識ストレプトアビジン陽性細胞（CD3+CD8+avidin+）の割合を差し引いた数値をWT1抗原ペプチ

ド特異的CTL前駆細胞の割合とした：

WT1抗原ペプチド特異的CTL前駆細胞 (%) =

$$[(\text{CD}3^+ \text{CD}8^+ \text{tetramer}^+ \text{細胞数} / \text{CD}3^+ \text{CD}8^+ \text{細胞数}) - (\text{CD}3^+ \text{CD}8^+ \text{avidin}^+ \text{細胞数} / \text{CD}3^+ \text{CD}8^+ \text{細胞数})] \times 100$$

【0065】

癌患者と健常人PBMCを解析した結果を表2に示す。また、この結果を疾患別にプロットしたものを図1に示す。この結果から、CD3/CD8陽性細胞中のWT1抗原ペプチド特異的CTL前駆細胞の割合は、健常人では0.47～1.30%で平均が0.82%であったが、造血器悪性腫瘍患者では、1.04～29.45%で平均が5.24%、肺癌患者では0.33～5.97%で平均が2.44%であり、統計解析により健常人に比べて造血器悪性腫瘍患者及び肺癌患者では有意に増加していることが明らかとなった ( $p < 0.05$ )。

【0066】

【表2】

検体名	CTL プリカーサー頻度 (%)
急性骨髓性白血病(AML) 患者 1	8.26
急性骨髓性白血病(AML) 患者 2	8.01
急性骨髓性白血病(AML) 患者 3	5.12
急性骨髓性白血病(AML) 患者 4	3.84
急性骨髓性白血病(AML) 患者 5	4.51
急性骨髓性白血病(AML) 患者 6	3.27
急性骨髓性白血病(AML) 患者 7	2.68
急性骨髓性白血病(AML) 患者 8	2.60
急性骨髓性白血病(AML) 患者 9	1.77
急性骨髓性白血病(AML) 患者 10	1.04
急性骨髓性白血病(AML) 患者 11	1.49
急性リンパ性白血病(ALL) 患者 1	7.32
急性リンパ性白血病(ALL) 患者 2	1.78
慢性骨髓性白血病(CML) 患者	2.46
骨髓異形成症候群(MDS)患者 1	29.45
骨髓異形成症候群(MDS)患者 2	2.99
骨髓異形成症候群(MDS)患者 3	2.81
骨髓異形成症候群(MDS)患者 4	2.08
肺癌患者 1	5.97
肺癌患者 2	3.83
肺癌患者 3	2.63
肺癌患者 4	1.89
肺癌患者 5	1.69
肺癌患者 6	0.72
肺癌患者 7	0.33
健常人 1	1.30
健常人 2	1.05
健常人 3	1.08
健常人 4	0.85
健常人 5	0.81
健常人 6	0.79
健常人 7	0.61
健常人 8	0.64
健常人 9	0.57
健常人 10	0.47

## 【0067】

## 【発明の効果】

本発明により、WT1特異的CTL前駆細胞の頻度を指標とした、WT1ワクチン応答性が高い患者の選択方法や、その選択のための臨床検査薬などが提供される。本発明の選択方法により、よりWT1ワクチン療法による効果の期待される

患者を選択することができ、適切な治療を施すことが可能となる。

【0068】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Haruo, Sugiyama

<120> Method for selecting a subject which is applicable to  
WT1 vaccine

<130> 190337

<160> 22

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 449

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro

1

5

10

15

Ser Leu Gly Gly Gly Gly Cys Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala Ala

20

25

30

Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr

35 40 45  
Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro Pro  
50 55 60  
  
Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro Ser Trp Gly Gly  
65 70 75 80  
  
Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Val His Phe  
85 90 95  
  
Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg Tyr Gly Pro Phe  
100 105 110  
  
Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe  
115 120 125  
  
Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile  
130 135 140  
  
Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Thr Pro Ser Tyr  
145 150 155 160  
  
Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Asn His Ser Phe  
165 170 175  
  
Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln  
180 185 190

Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser

195

200

205

Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp

210

215

220

Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln

225

230

235

240

Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala Gly Ser Ser Ser

245

250

255

Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Ser Thr Gly Tyr Glu

260

265

270

Ser Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile

275

280

285

His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Pro

290

295

300

Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys

305

310

315

320

Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys

325

330

335

Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro

340

345

350

Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp

355

360

365

Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln

370

375

380

Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys Thr

385

390

395

400

His Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys

405

410

415

Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val

420

425

430

Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala

435

440

445

Leu

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic Peptide

<400> 2

Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu

1

5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic Peptide

<400> 3

Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu

1

5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic

## Peptide

&lt;400&gt; 4

Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu

1

5

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Synthetic

Peptide

&lt;400&gt; 5

Arg Tyr Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe

1

5

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Synthetic

Peptide

<400> 6

Ser Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu

1

5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
Peptide

<400> 7

Ala Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu

1

5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
Peptide

<223> Xaa at 1 position stands for Abu.

<400> 8

Xaa Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu

1

5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
Peptide

<400> 9

Arg Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu

1

5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
Peptide

<400> 10

Lys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu

1

5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
Peptide

<400> 11

Arg Tyr Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu

1

5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
Peptide

<400> 12

Arg Tyr Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu

1

5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
Peptide

<400> 13

Ala Tyr Leu Pro Ala Val Pro Ser Leu

1

5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
Peptide

<400> 14

Asn Tyr Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu

1

5

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
Peptide

&lt;400&gt; 15

Arg Val Pro Gly Val Ala Pro Thr Leu

1

5

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic  
Peptide

&lt;400&gt; 16

Arg Tyr Pro Ser Ser Gln Lys Lys Phe

1

5



<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
Peptide

<400> 17

Arg Tyr Pro Ser Ala Gln Lys Lys Phe

1

5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
Peptide

<223> Xaa at 5 position stands for Abu.

<400> 18

Arg Tyr Pro Ser Xaa Gln Lys Lys Phe

1

5

<210> 19

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR Primer

<400> 19

ccatggcag ccattctatg cgctatttt ctacctccgt 40

<210> 20

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR Primer

<400> 20

ggatcctggc tcccatctca gggtgagggg cttgggcaga ccctc 45

<210> 21

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR Primer

<400> 21

catatgatcc agcgtacccc gaaaattcag

30

<210> 22

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR Primer

<400> 22

ggatccttac atgtctcgat cccacttaac

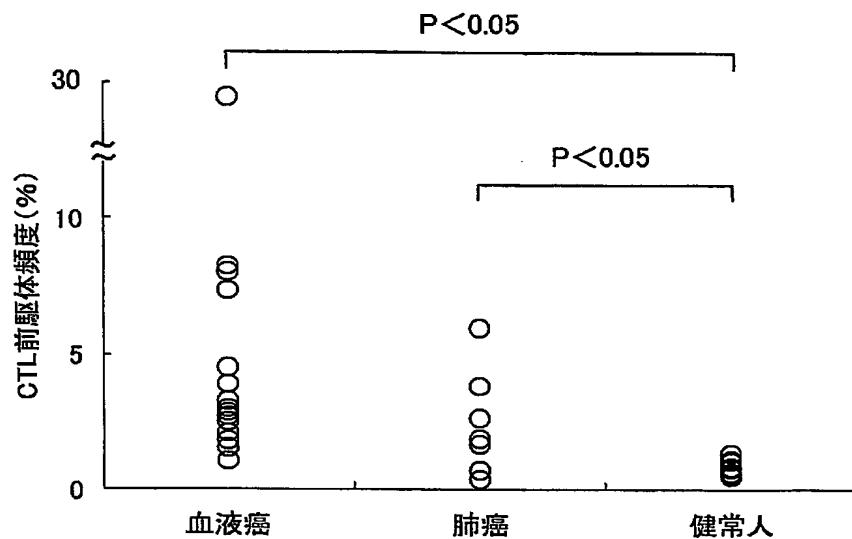
30

### 【図面の簡単な説明】

【図1】 癌患者と健常人におけるWT1特異的CTL前駆細胞の存在頻度を示すグラフである。図中、縦軸はCTL前駆体（前駆細胞）の頻度を示す。また図中、血液癌はHLA-A2402陽性の造血器悪性腫瘍患者の結果を、肺癌はHLA-A2402陽性の肺癌患者の結果を、健常人はHLA-A2402陽性の健常人の結果をそれぞれ示す。

【書類名】 図面

### 【図1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 WT1特異的CTL前駆細胞の頻度を指標とした、WT1ワクチン応答性が高い患者の選択方法や、その選択のための臨床検査薬などを提供すること。

【解決手段】 (a) CTL前駆細胞を含む生体試料を被験患者より単離する工程、(b) 前記(a)の生体試料中に存在するWT1特異的なCTL前駆細胞の存在頻度または量を測定する工程、および(c) 前記(b)の測定結果に基づいてWT1ワクチン応答性を判断する工程、を含む、WT1ワクチン応答性が高い患者の選択方法等。

【選択図】 なし

特願 2003-184436

出願人履歴情報

識別番号 [595090392]

1. 変更年月日 1995年 6月 1日

[変更理由] 新規登録

住所 大阪府箕面市船場西2-19-30  
氏名 杉山 治夫